

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ ГЕНЕРИРУЕМОГО ПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА

Л.А. Хамидуллина, А.И. Матерн

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет

имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», г. Екатеринбург

Кислород является самым распространенным химическим элементом биосферы, его соединения входят в состав всех живых организмов на планете. Около 90 % потребляемого человеком кислорода вовлекается в реакции окислительного фосфорилирования, вместе с тем во всех живых организмах постоянно протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов (АКМ), в том числе ферментативных продуктов активации кислорода (АФК). Многие из этих соединений являются свободными радикалами.



Активные формы кислорода (АФК) играют двойственную биологическую роль в организме человека. АФК являются необходимым элементом фагоцитоза, при котором происходит разрушение поврежденных, старых, иммунологически несовместимых или злокачественных клеток и клеток, пораженных вирусами. Однако, при воздействии ряда неблагоприятных факторов, наблюдается избыточное образование АФК. Его патологические последствия проявляются при чрезмерном накоплении АФК и продуктов окисления биомолекул – состоянии, называемом окислительным стрессом. Факторы, вызывающие окислительный стресс, различны, но все они приводят к окислительной модификации макромолекул, т.е. повреждению ДНК, белков, липидов и т.д.

Функционирование и развитие клеток в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, к которым относятся специализированные ферментативные и неферментативные антиоксиданты. В здоровом организме сохраняется равновесие в системе окислители-антиоксиданты. Поддержание окислительно-восстановительных реакций на стационарном уровне обеспечивается непрерывным действием согласованной антиоксидантной системы. Отсутствие или сбой этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса, который является составным элементом целого ряда физиологических и патофизиологических феноменов и процессов. Для коррекции состояния антиоксидантной системы необходима информация о наличии и интенсивности окислительного стресса, что может быть сделано путем оценки антиоксидантной активности (АОА) различных биологических сред.

Существует ряд методов оценки состояния антиоксидантной системы. Основными из них являются: определение радикальной активности, продуктов перекисного окисления макромолекул, индивидуальных антиоксидантов (АО) (ферментативных и неферментативных) и оценка интегральной антиоксидантной активности. Сложность методик и аппаратуры, возможность использования только для анализа неокрашенных жидкостей, отсутствие единого терминологического подхода, неоднозначность данных препятствуют их применению в медицинской экспресс-диагностике.

Для измерения антирадикальной активности (АРА) используют разные химические и физико-химические методы, чаще всего основанные на прямом или косвенном измерении скорости или полноты реакции антиоксиданта с реагентом. На сегодняшний день широко известны следующие три типа методов, основанных на следующих измерениях: потребление кислорода; образование продуктов окисления; поглощение (или связывание) свободных радикалов. В первом и во втором случаях АРА определяется на основе ингибирования степени,

или скорости потребления кислорода, или образования продуктов. Основные методы:

ORAC — oxygen radical absorbance capacity;

TRAP — total radical trapping antioxidant parameter;

FRAP — ferric reducing antioxidant power;

TEAC — (Randox) — trolox equivalent antioxidant capacity;

ABTS — [2, 2'] — azinobis (3-ethylbenzthiazoline)- 6-sulfonic acid;

TBARS — thiobarbituric acid reactive substance.

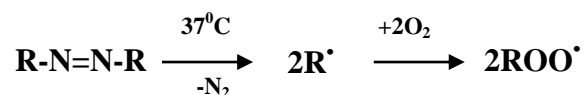
Во многих методах измерения антирадикальной активности используются искусственно синтезируемые радикалы, не моделирующие процессы свободнорадикального окисления, включенные в метаболизм в организме человека. Чаще всего измеряется антирадикальная активность к свободным синтетическим долгоживущим радикалам (ABTS, DPPH, AAPH и др.). Однако, зачастую высокий интерес представляет взаимодействие веществ с антирадикальными свойствами с конкретными радикалами, образующимися в результате окислительно-восстановительных реакций в процессе метаболизма или при окислительном стрессе: гидроксильный, алкоксильный, перекисный и др. Существующие в настоящее время методы обладают также такими недостатками, как высокая стоимость оборудования и реактивов, трудоемкость или низкая чувствительность. Поэтому существует необходимость разработки новых методов исследования антирадикального действия большого спектра соединений.

Наиболее доступными и экспрессными методами оценки АРА являются электрохимические методы. Кроме преимуществ, связанных с доступностью, низкой стоимостью аппаратуры и реактивов, они позволяют напрямую оценить электронодонорно-акцепторные свойства исследуемой системы, т.е. свойства определяющие, антиоксидант/оксидантный баланс организма.

Цель работы: разработка нового метода исследования антирадикальной активности на модели генерируемого пероксидного радикала с использованием потенциометрического метода.

В данной работе было предложено исследовать зависимость изменения потенциала системы в процессе генерирования свободных радикалов с последующим его взаимодействием с веществами антирадикального действия.

В качестве источника пероксидных радикалов использовали водорастворимый азоинициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (AAPH), который при термическом воздействии разлагается по следующей схеме:



В качестве вещества с антирадикальным действием использовали аскорбиновую кислоту.

Потенциометрические измерения проводили с использованием pH meter-pH 410 (Аквилон, г. Санкт-Петербург). Применяли двухэлектродную электрохимическую ячейку: хлоридсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl / нас. KCl) и платиновый электрод для измерения окислительно-восстановительного потенциала в качестве рабочего электрода.

Антирадикальную активность оценивали по величине периода индукции (τ , сек). Увеличение измеряемого потенциала (рисунок, участок АВ) обусловлено увеличением концентрации радикала, образующегося во время термического разложения AAPH. Из литературных данных известно, что термическое разложение AAPH протекает с постоянной скоростью W_i . При введении в раствор инициатора в фосфатном буфере (pH 7,1) аскорбиновой кислоты наблюдалось резкое уменьшение измеряемого потенциала, обусловленное ингибированием процесса генерации радикалов. По мере расходования антиоксиданта наблюдалось увеличение измеряемого потенциала, что связано с замедлением скорости ингибирования (участок ВС). В конечном итоге потенциал вышел на тот же уровень, что был до введения антиоксиданта.

Время от начала введения в раствор AAPH аскорбиновой кислоты (точка В) до выхода потенциала на прежний уровень (точка С) считали «периодом

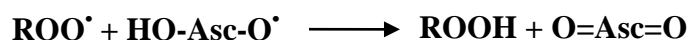
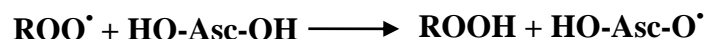
индукции». Точку окончания индукционного периода определяли путем двойного дифференцирования экспериментальной зависимости.

Скорость генерирования пероксидных радикалов определяли в предыдущих работах по изменению потенциала медиаторной системы при совместном инкубировании ААРН с медиаторной системой. Эти результаты согласуются с опубликованными в литературе данными, полученными другими методами.

Антирадикальную активность (АРА) рассчитывали как произведение скорости генерирования на период индукции.

$$АРА = n[АО] = W_i \cdot \tau$$

По литературным данным реакция взаимодействия пероксидного радикала, генерируемого ААРН, с аскорбиновой кислотой может протекать по следующей схеме:



Как видно из приведенных схем реакций, регенерация ААРН может приводить к накоплению радикалов аскорбата и дегидроаскорбата.

Рассчитанная антирадикальная активность $6,7 \cdot 10^{-5}$ М раствора аскорбиновой кислоты составила $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, что соответствует количеству групп аскорбиновой кислоты, ингибирующих генерирование пероксидных радикалов и согласуется с литературными данными. Полученные данные свидетельствуют о протекании реакции взаимодействия пероксидного радикала и антиоксиданта с образованием дегидроаскорбата в качестве продукта.

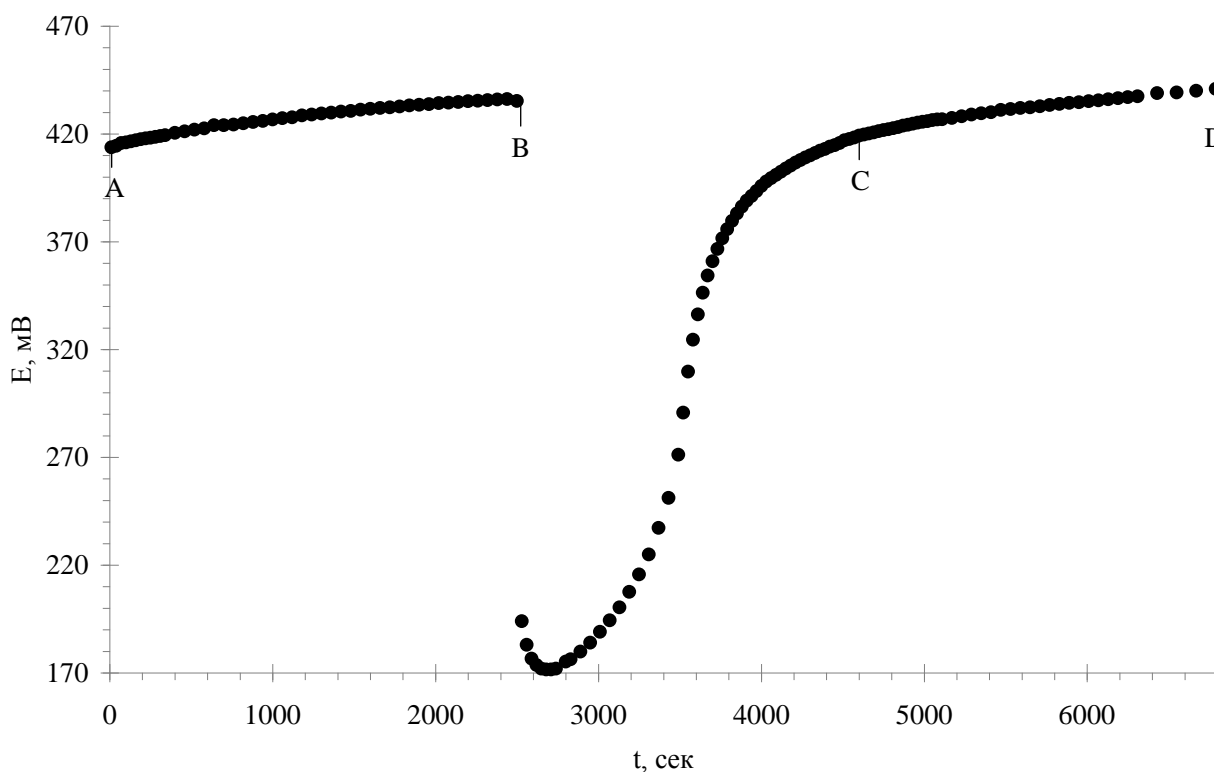


Рисунок. Зависимость потенциала электрода в растворе, содержащем ААРН от времени, наблюдающаяся при генерации пероксидных радикалов. А – начало измерения потенциала, $C_{\text{ААРН}} = 0,03 \text{ M}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,1$ (фосфатный буфер), В – введение аскорбиновой кислоты, $C_{\text{аск.к-ты}} = 6,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $t = 2500 \text{ сек}$

Полученные результаты свидетельствуют, что потенциометрический метод позволяет определить индукционный период при прямом измерении потенциала.

Таким образом, показано, что использованием потенциометрического метода исследования антирадикальной активности на модели генерируемого радикала (пероксильного, алкоксильного, гидроксильного и др.) является перспективным и требует дальнейшего развития. Различные вещества с антирадикальным действием (натуральные, синтетические, моделирующие плазму крови) будут изучены потенциометрическим методом с использованием моделей генерирования различных радикалов.